

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 773 171**

(21) N° d'enregistrement national : **97 16799**

(51) Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 11/14

(12)

**BREVET D'INVENTION**

**B1**

(54) ENZYMES IMMOBILISEES SUR UN SUPPORT, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS.

(22) Date de dépôt : 31.12.97.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : SOCIETE CIVILE ASE & BIO — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 02.07.99 Bulletin 99/26.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 13.10.00 Bulletin 00/41.

(72) Inventeur(s) : DUVAL RAPHAEL et YVIN JEAN CLAUDE.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

FR 2 773 171 - B1



**ENZYMES IMMOBILISÉES SUR UN SUPPORT, LEURS PROCÉDÉS DE  
PRÉPARATION ET LEURS APPLICATIONS**

5           L'invention a pour objet des enzymes immobilisées sur un support.

          L'intérêt des enzymes immobilisées réside essentiellement dans la possibilité de les récupérer sans difficulté à partir du milieu dans lequel elles ont été mises en oeuvre  
10       et dans lequel l'enzyme proprement dite développe ses activités pour lesquelles elle est classiquement utilisée, de les purifier en tant que de besoin et de les remettre à agir dans un autre milieu.

          L'invention vise également les procédés de  
15       préparation de ces enzymes immobilisées ainsi que leurs applications.

          On connaît déjà des enzymes immobilisées sur un support d'alumine.

          Ainsi, le document EP-A-86 402014.4 décrit l'immo-  
20       bilisation des protéases sur des alumine-phosphates organiques.

          Selon ce document, la protéase est rattachée par une liaison covalente à un complexe solide formé par de l'alumine liée à un composé bi- ou polyfonctionnel  
25       comportant un groupe fonctionnel phosphate et un groupe capable de former une liaison covalente avec une protéase.

          La préparation, selon le susdit document, de la protéase ainsi immobilisée, consiste à fixer sur de l'alumine, en tant que composé bifonctionnel, un phosphate  
30       organique comportant un groupe réactionnel capable de former une liaison covalente avec une protéase, puis à faire réagir le complexe ainsi formé avec la protéase après avoir éventuellement activé le groupe réactif comporté par le groupe, en ayant recours à des activateurs appropriés, de  
35       façon à former la liaison covalente recherchée liant la

protéase au complexe.

Il est également connu --voir à cet égard le document "Bioscience Reports" vol. 8, No.3, 1988, page 266-- de former dans un premier temps une phosphoprotéase en faisant réagir le composé bifonctionnel dont il a été question ci-dessus avec la protéase en question de façon à former une liaison covalente entre la protéase et le groupe chimiquement réactif comporté par ledit composé, éventuellement après activation de celui-ci, puis à fixer la phosphoprotéase ainsi constituée sur de l'alumine par réaction de celle-ci avec le groupe réactionnel phosphate comporté par le composé bifonctionnel.

La constitution chimique de l'enzyme immobilisée obtenue par le premier des deux susdits procédés, n'est pas la même que celle de l'enzyme immobilisée obtenue par le susdit deuxième procédé.

Il s'ensuit que les activités des deux types de protéases immobilisées ainsi obtenues ne sont pas identiques.

Il est enfin connu, par le susdit document, d'utiliser les enzymes ainsi immobilisées dans leurs applications classiques.

L'invention a pour objet, surtout, de répondre au souhait des utilisateurs de disposer d'un éventail aussi large que possible d'enzymes immobilisées sur un support.

Et les inventeurs ont eu le mérite de trouver que, de façon surprenante et inattendue, il est possible d'immobiliser les enzymes sur un support à base d'oxydes minéraux autre que l'alumine.

Il s'ensuit que l'enzyme immobilisée conforme à l'invention est caractérisée par le fait qu'elle est constituée par une enzyme quelconque, notamment choisie dans le groupe comprenant les osidases et en particulier la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases, immobilisée par fixation à l'aide d'une liaison covalente sur un complexe

solide insoluble formé entre un oxyde minéral autre que l'alumine et choisi de préférence dans le groupe comprenant notamment la zircone, la silice et le dioxyde de titane et un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate par lequel il est lié à l'oxyde minéral et, d'autre part, un groupe chimique réactif, activé en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, ce groupe chimique réactif formant la liaison covalente avec l'enzyme.

Le procédé de préparation de l'enzyme immobilisée conforme à l'invention est caractérisé par le fait

- que l'on sélectionne

- une enzyme quelconque, de préférence dans le groupe comprenant les osidases et notamment la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases,

- un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate et, d'autre part, un groupe chimique réactif capable, après activation en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, de former une liaison covalente avec la susdite enzyme et

- un oxyde minéral autre que l'alumine en tant que support, de préférence dans le groupe comprenant la zircone, la silice et le dioxyde de titane, et

- que

- soit, dans une première étape, on fixe le composé bi- ou polyfonctionnel sur le support par son groupe réactionnel phosphate en formant un complexe entre le composé et le support puis, dans une deuxième étape, on fait réagir le complexe ainsi formé avec l'enzyme de façon à créer une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel après avoir activé ce dernier en tant que de besoin,

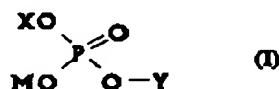
- soit, dans une première étape, on constitue une

phosphoenzyme en faisant réagir le composé bi- ou polyfonctionnel avec l'enzyme de façon à former une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif, comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel, après activation en tant que de besoin puis, dans une deuxième étape, on fixe la phosphoenzyme ainsi formée sur le support par réaction de celui-ci avec le groupe réactionnel phosphate du composé bi- ou polyfonctionnel.

L'oxyde minéral peut être utilisé sous forme de poudres ou de membranes obtenues selon des procédés classiques décrits notamment dans *"Chromatographies en phases liquide et super-critique"* par Robert Rosset, Marcel Caude et Alain Jardy, 1991, Edition Masson.

Dans un mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale

20

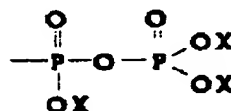
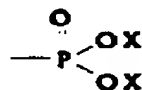


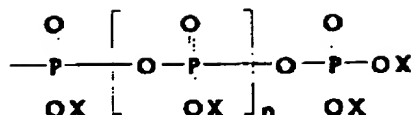
dans laquelle

- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,

- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules

30





5 avec n variant de 1 à 100 000, et

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldéhyde ou ester, est soit un

10 groupe alkyle linéaire ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la

15 partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldéhyde, il doit être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

L'agent activateur est un composé chimique qui

20 comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions amine ou acide carboxylique, comportées par les enzymes et que l'on fait réagir avec ceux des composés bi- ou polyfonctionnels qui, à titre de groupe chimique réactif, comportent une fonction amine, alcool ou

25 acide carboxylique.

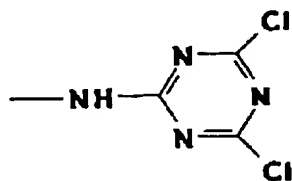
Dans un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, l'agent activateur, qui peut être mis en oeuvre selon les techniques de Howard H. Weetall publiées dans

30 "Applied Biochemistry and Biotechnology" (1993) 41, 157-188, et auquel il convient d'avoir recours quand le groupe chimique réactif comporté par ledit composé bi- ou polyfonctionnel est différent des fonctions thiol ou aldéhyde, est choisi dans le groupe comportant les dérivés

35 dont les formules sont indiquées ci-après après activation

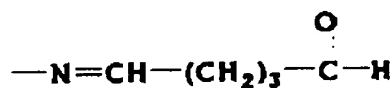
d'un groupe chimique réactif comporté par ledit composé bi- ou polyfonctionnel et constitué par une fonction amine acide carboxylique ou alcool, la nature de cette fonction étant mentionnée pour chacun desdits dérivés, à savoir

5



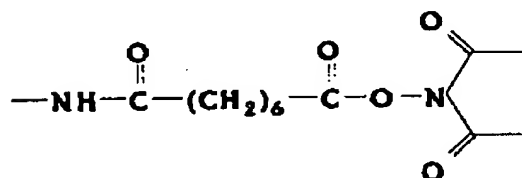
10

(activation amine + trichloro-triazine)



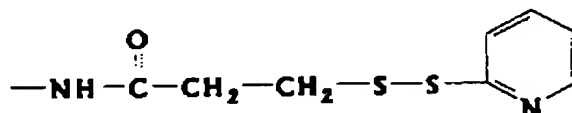
15

(activation amine + glutaraldéhyde)



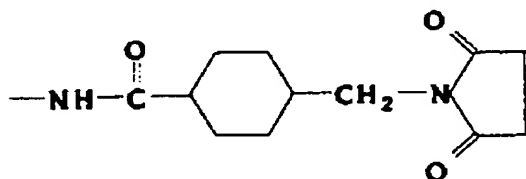
20

(activation amine + DSS ou disuccinimidy-subérate)



25

(activation amine + SPDP ou succinimidy-3-(2-pyridyldithio)propionate)

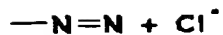


30

(activation amine + SMCC ou succinimidy-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate)

35

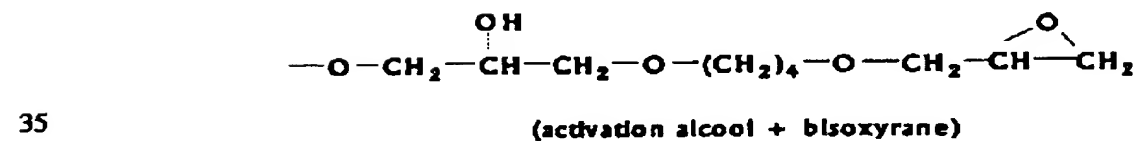
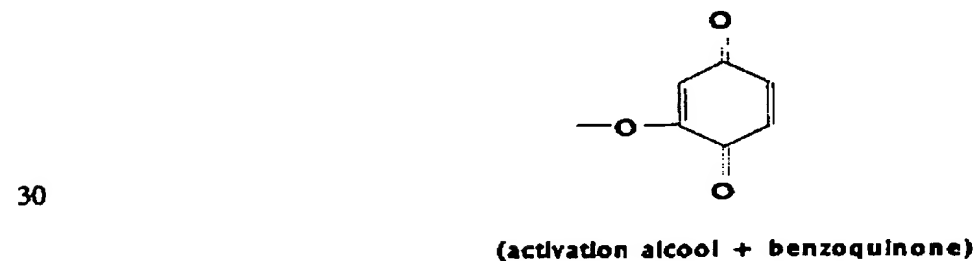
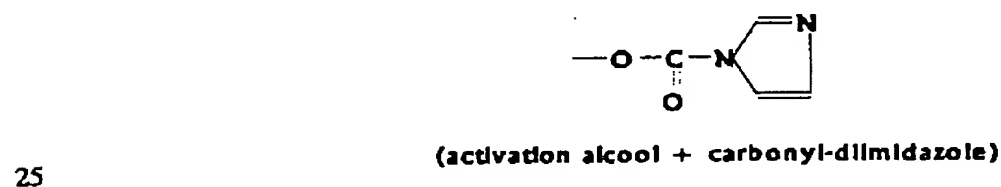
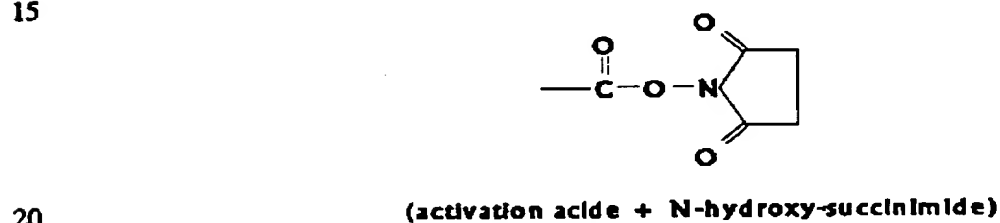
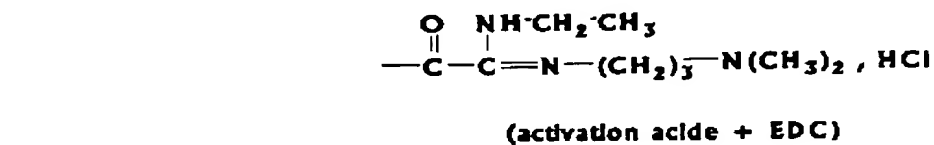
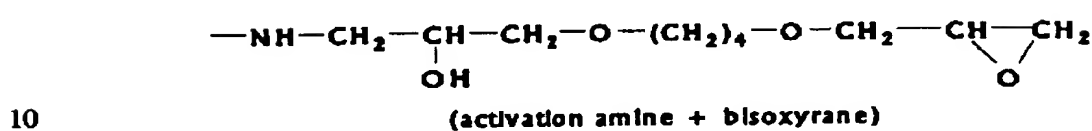
7



(activation amine + nitrite de sodium)

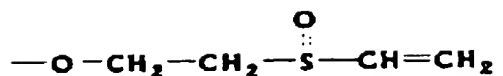


(activation amine + 4-nitrophényl-chloroformate)



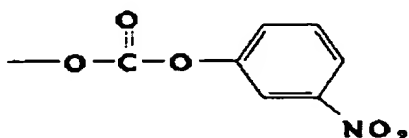


8



(activation alcool + divinylsulfone)

5

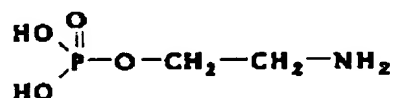


(activation alcool + 3-nitrophényl-chloroformate)

10

A titre d'exemple non limitatif mais illustrant un mode de réalisation avantageux, on indique que l'activation par mise en oeuvre des techniques décrites par Howard H. Weetall dans *"Applied Biochemistry and Biotechnology"* (1993) 41, 157-188, d'un composé bifonctionnel de formule (I) dans lequel le groupe chimique réactif activé est une fonction amine, est obtenue par réaction de cette fonction amine, comportée en l'occurrence par le 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate de formule

20



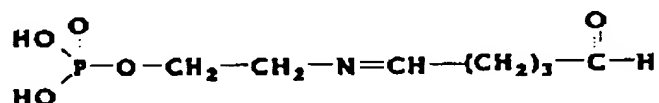
avec le glutaraldéhyde de formule

25



le composé bifonctionnel activé ainsi obtenu ayant donc une fonction 5-iminopentanal et répondant à la formule

30



35

Du point de vue pratique, on fait réagir 30 ml d'une solution aqueuse à 0,05 M du 2-aminoéthyl-dihydrogéo-

phosphate avec 30 ml d'une solution aqueuse 0,05 M de glutaraldéhyde.

5       Après 30 minutes d'agitation du mélange à une température de 20 à 25°C, la réaction est complète et la solution du composé bifonctionnel activé ainsi obtenu peut être conservée à une température de 5 à 10°C pendant 300 jours avant son utilisation ultérieure.

10       Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, la fixation du composé bi- ou polyfonctionnel sur un support à base de dioxyde de titane est réalisée en faisant réagir une solution aqueuse du composé bi- ou polyfonctionnel avec une suspension du dioxyde de titane dans un milieu aqueux.

Du point de vue pratique, on procède comme suit.

15       A une solution de 60 mg de 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate dans 100 ml d'eau à 25°C, on ajoute 3 g de dioxyde de titane.

Le mélange est maintenu sous légère agitation pendant 24 heures à pH 7.

20       Au bout de cette durée, la fixation du 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate est totale, ce qui est vérifié par le test à la ninhydrine sur une partie aliquote de filtrat.

La suspension est filtrée et le rétentat est lavé avec trois fois 100 ml d'eau.

25       On obtient ainsi l'oxyde de titane ayant fixé le 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate à l'état humide; on le met en suspension dans 10 ml d'une solution 1 M de glutaraldéhyde.

On ajuste le pH à 7 et on agite pendant trois heures à 20-25°C.

30       On lave avec cinq fois 100 ml d'eau.

Le complexe d'oxyde de titane activé ainsi obtenu est désigné par "Ti-Pc-Glut".

35       Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, l'immobilisation de l'enzyme par réaction avec le

groupe chimique réactif activé du composé bifonctionnel fixé sur le support à base d'oxyde minéral est effectuée en milieu aqueux et à une température de 25°C.

5 A titre d'exemple non limitatif mais illustrant un mode de réalisation avantageux, on indique que, lorsqu'il s'agit de faire réagir une protéase, par exemple la  $\alpha$ -chymotrypsine, avec le complexe obtenu ci-dessus, on procède comme indiqué ci-après.

10 3,02 grammes du complexe activé "Ti-Pc-Glut" sont mis en suspension dans 10 ml d'eau, puis mélangés à une solution aqueuse de 60 mg d' $\alpha$ -chymotrypsine. Le pH du milieu est ajusté au pH d'activité maximum de l'enzyme, à savoir 7, et doit être réajusté en cours d'expérience si nécessaire; on peut utiliser du HCl 0,1 N.

15 Par filtration de la suspension sur fritté n°4, on récupère l' $\alpha$ -chymotrypsine immobilisée sur oxyde de titane.

On désigne ce produit par l'appellation "Ti-Pc-Glut-Chymot".

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, on prépare une phosphoenzyme en faisant réagir l'enzyme en solution aqueuse sur le composé bifonctionnel de formule (I) éventuellement activé, également en solution aqueuse.

25 Lorsque le composé bifonctionnel est le résultat de la réaction du pyrophosphate de thiamine et du glutaraldéhyde et que l'enzyme est la  $\beta$  1-3 glucanase, on peut procéder comme indiqué ci-après.

30 460,8 mg ( $10^{-3}$  moles) de pyrophosphate de thiamine sont mis en solution dans 500 ml d'eau et mélangés à 400 ml d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 25% (soit 100 mg à 100% ou  $10^{-3}$  moles) et le mélange est agité pendant 3 heures à 20-25°C. On ajoute ensuite 2 g d'enzyme native, à savoir la  $\beta$  1-3 glucanase, en solution dans 1000 ml d'eau. Le pH est  
35 ajusté à 4,50 par addition de soude 0,1 N. On ajoute ensuite

250 mg de cyanoborohydrure de sodium à titre d'agent réducteur des fonctions imines. Le pH est maintenu à 4,50 à l'aide d'HCl 0,1 N ou de soude 0,1 N. Après 3 heures d'agitation, la solution réactionnelle est soumise à une dialyse pour éliminer les réactifs en excès.

On obtient ainsi la phospho- $\beta$ -1-3-glucanase désignée par "TPP-Glut"

Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, on réalise l'immobilisation de la phospho- $\beta$ -1,3-glucanase obtenue ci-dessus sur un support à base de dioxyde de titane en faisant réagir sous agitation, pendant 3 à 24 heures, une suspension de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200  $\mu$ m avec le dialysat de la phosphoenzyme obtenu ci-dessus.

La progression de l'absorption est suivie par détermination à intervalles réguliers de l'activité enzymatique résiduelle d'échantillons du filtrat du susdit mélange.

Après disparition totale de l'activité enzymatique (2 à 4 heures en général), le milieu réactionnel est filtré et lavé abondamment à l'eau.

La phosphoenzyme immobilisée ainsi obtenue est conservée telle quelle, c'est-à-dire humide, au réfrigérateur à +4°C jusqu'à utilisation. Son activité enzymatique est déterminée par hydrolyse de son substrat spécifique.

Les enzymes immobilisées conformes à l'invention sont utilisées pour le traitement des milieux à l'égard desquels elles développent les activités pour lesquelles elles sont utilisées classiquement.

Parmi ces traitements, on peut citer les transformations chimiques, les purifications ou la séparation de molécules organiques, organo-minérales ou minérales.

Les susdits traitements utilisent un milieu de mise en oeuvre aqueux ou hydroorganique ou contenant uniquement des solvants organiques; ce milieu peut être un gaz liquéfié utilisé à l'état critique, sub-critique, ou super-critique; la

température du milieu peut varier de  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $+200^{\circ}\text{C}$  et la pression exercée sur le milieu peut varier de 0,1 à 300 bars en valeur absolue.

5     **EXEMPLE 1**

**Préparation de la  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur dioxyde de titane.**

On a procédé successivement suivant les deux variantes du procédé conforme à l'invention.

10     **Première variante**

Dans un réacteur en verre de 4 litres, muni d'une agitation mécanique, d'un thermomètre et d'une ampoule de coulée, on charge:

- 3 litres d'eau déminéralisée et
- 15     - 10,70 g de pyrophosphate de thiamine.

Le milieu réactionnel est agité à une température de  $20-25^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la dissolution totale du pyrophosphate de thiamine.

On ajoute alors 500 g de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200  $\mu\text{m}$  sous agitation lente (30 t/min).

On agite pendant 15 minutes et on ajuste, si nécessaire, le pH à 4,5 avec une quantité suffisante d'acétate de sodium.

On agite pendant 12 heures à une température de 20 à  $25^{\circ}\text{C}$  à 30 t/min en vérifiant le pH toutes les heures et en le réajustant si nécessaire.

La cinétique de fixation du pyrophosphate de thiamine est suivie au moyen du test de coloration à la ninhydrine.

Après 12 heures d'agitation, l'insoluble est filtré sur fritté n°2 puis lavé abondamment avec trois fois 0,5 litre d'eau déminéralisée.

L'insoluble humide est récupéré et chargé à nouveau dans un réacteur en verre de 4 litres contenant une solution 1 M de glutaraldéhyde préalablement préparée en mélangeant  
35     270 ml de glutaraldéhyde 5,6 M (commercialisée par la Société

FLUKA sous la référence 49629) avec 1231 ml d'eau déminéralisée.

On agite à 30 t/min et à une température de 20 à 25°C pendant 24 heures.

5 On filtre sur fritté n°2 puis on lave avec trois fois 0,5 litre d'eau déminéralisée.

10 L'insoluble humide est récupéré et chargé dans un réacteur de 4 litres contenant une solution préalablement préparée en dissolvant 3 g de  $\beta$  1-3 glucanase commercialisée sous la marque GLUCANEX par la Société NOVO INDUSTRIES dans 1,5 litres d'acétate de sodium 2,1 M de pH 4,55.

On agite à une température de 20 à 25°C pendant 24 heures à une vitesse de 30 t/min.

15 On filtre sur fritté n°2 et on lave le résidu de filtration trois fois avec 0,5 litre d'eau déminéralisée.

On récupère le précipité humide constitué par l'enzyme immobilisée recherchée et on le conserve à une température de 4 à 6°C jusqu'à l'utilisation.

#### Deuxième variante

20 Dans un réacteur en verre de 20 litres, muni d'une agitation, d'un thermomètre et d'une ampoule de coulée, on charge:

- 4,61 g de pyrophosphate de thiamine et
- 5 litres d'eau déminéralisée.

25 On agite jusqu'à dissolution totale.

On additionne par l'ampoule de coulée, en veillant à ce que la température ne dépasse pas 30°C, 4 litres de glutaraldéhyde en solution aqueuse à 25%.

30 On agite la solution ainsi obtenue pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C.

On ajoute ensuite une solution, préalablement préparée, de 20 g de  $\beta$  1-3 glucanase commercialisée sous la marque GLUCANEX par la Société NOVO INDUSTRIES dans 10 litres d'eau déminéralisée.

35 On ajuste le pH à 4,5 avec la quantité nécessaire de

soude 0,1 N.

On agite pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C, puis on refroidit à 20°C.

5 On ajoute ensuite en une seule fois 2,5 g de cyanoborohydrure de sodium.

On agite ensuite pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C, puis on soumet le milieu réactionnel à une dialyse.

10 On récupère le dialysat et on le charge dans un réacteur en verre de 20 litres muni d'une agitation réglée à 30 t/min.

On ajoute ensuite dans la masse réactionnelle 1 kg de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200 µm.

On agite encore pendant 24 heures à une température de 20 à 25°C et on filtre sur fritté n°2 ou au buchner.

15 On lave le résidu avec trois fois 3 litres d'eau déminéralisée.

On conserve le résidu humide constituant l'enzyme immobilisée recherchée à une température de 4°C jusqu'à son utilisation.

20

\*\*\*

25 La mise en oeuvre de la  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée obtenue à l'exemple 1, par exemple pour "digérer" un substrat constitué par du  $\beta$  1-3 glucane, peut être réalisée en lit fixe ou en lit fluidisé.

Ci-après, on décrit les deux modes de réalisation en question.

30 Lorsqu'on a recours au lit fixe, on fait circuler la solution de substrat à travers un lit fixe de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur dioxyde de titane telle qu'obtenue à l'exemple 1.

Cette enzyme immobilisée est tassée, par exemple par compression pneumatique dans une colonne basse pression; on peut utiliser celle de type Vantage A de marque AMICON.

La solution de substrat circule en circuit fermé.

35 Pour une efficacité optimale, on détermine un compromis entre le réglage du débit, le temps de séjour de

la solution au contact de l'enzyme immobilisée (qui doit être suffisamment important pour permettre la réalisation de l'hydrolyse enzymatique) et le temps de passage d'un volume entier de solution à travers le circuit (temps qui doit être  
5 relativement court, afin de réaliser un maximum de passages en un temps donné).

La durée totale de séjour au contact de l'enzyme immobilisée ne dépend que du volume de cette dernière et de la durée totale de l'opération.

10 Un essai est réalisé sur 10 litres d'une solution de  $\beta$  1-3 glucane à 10 g/l, préalablement clarifiée par filtration à 1,6  $\mu$ m.

Le dispositif utilisé, montré à la figure 1, comprend les éléments suivants:

- 15 - une cuve thermostatée 1 d'une capacité de par exemple 50 litres, munie d'un système d'agitation 2 et contenant la solution de substrat,
- une pompe péristaltique 3, par exemple du type Watson-Marlow,
- 20 - un manomètre à membrane 4,
- une masse 5 d'enzyme  $\beta$  1-3 glucanase fixée sur dioxyde de titane, tassée entre deux plateaux 7 et 8 dans une colonne 6 basse pression,
- une canalisation 9 par laquelle la solution de  
25 substrat est acheminée vers la colonne 6 à l'intérieur de laquelle elle est amenée par un tube 10 traversant le plateau 7 jusqu'à la surface de la masse 5,
- une canalisation 11 par laquelle la solution de substrat ayant traversé le lit d'enzyme immobilisée est  
30 extraite de la colonne 6 à travers le plateau 8 grâce à un trou 12 et recyclée vers la cuve 1.

Le manomètre situé en amont de la colonne permet de mesurer la perte de charge provoquée par le lit d'enzyme immobilisée, sachant que la pression en sortie de colonne  
35 est négligeable étant donné les faibles débits de l'ordre de



10 l/h fournis par la pompe péristaltique. On constate qu'à débit nul, le manomètre indique une faible pression (inférieure à 0,5 bar) probablement due à un accroissement local de celle-ci entre la pompe et l'entrée de la colonne du fait de la conception du circuit.

5 La masse d'enzyme immobilisée dans le mode de réalisation montré est de 3 grammes de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur 500 g de dioxyde de titane; elle est tassée sur une hauteur de 14,5 cm, ce qui, compte tenu des dimensions de la colonne (hauteur égale à 47,5 cm et diamètre égal à 6,2 cm), correspond à un volume d'enzyme immobilisée de 0,9 litre.

10 La solution de substrat est thermostatée à 40°C au sein de la cuve 1. Les pertes de chaleur étant relativement faibles, l'ensemble du circuit atteint rapidement cette température, ensuite entretenue par la circulation du liquide.

15 Une quantité de 10 litres de substrat à 1% de  $\beta$  1-3 glucane, préalablement clarifié par filtration à 1,6  $\mu$ m, est introduite dans la cuve thermostatée. Le thermostat est réglé à 56°C afin d'obtenir 40°C dans la cuve, température optimale de l'hydrolyse enzymatique. Une fois la température stabilisée, la pompe péristaltique est mise en route. La température varie peu ensuite, car les pertes de chaleur dans la colonne et le circuit sont minimes.

20 La puissance de la pompe péristaltique est réglée de façon à obtenir une pression de 1,5 bar à l'entrée de la colonne. Au-delà d'une telle pression, l'enzyme immobilisée subit des contraintes qui, à plus ou moins long terme, pourraient affecter son efficacité et sa stabilité. Le débit associé à une telle pression est de 13,2 l/h.

25 Dans ces conditions, le temps de passage "t-passage" est de 45 minutes. A chaque passage dans la colonne, le temps de séjour "t-séjour" au contact de l'enzyme est de 4 minutes. La circulation de la solution de substrat est

effectuée durant 5 heures 30 minutes.

Les cinétiques réactionnelles obéissent à des phénomènes de transports interfaciaux. Ceux-ci sont un facteur limitant dans la réaction d'hydrolyse enzymatique.

5 Le procédé "lit fixe" qui en lui-même est satisfaisant, présente un inconvénient qui est dû à l'hétérogénéité existant entre le lit de particules et la solution qui le traverse, ce qui a pour effet de placer la réaction d'hydrolyse sous contrôle diffusionnel.

10 De plus, progressivement, il se crée dans ce lit des canaux préférentiels de circulation du liquide.

Dès lors, certaines régions du lit ne sont plus irriguées et les molécules qui traversent les canaux préférentiels ne sont plus mises au contact du lit et donc de l'enzyme.

15 Cet inconvénient n'est toutefois pas de nature à rendre inutilisable le procédé en lit fixe.

On peut néanmoins remédier à cet inconvénient en ayant recours à un système à lit fluidisé.

20 La fluidisation du lit de particules d'enzyme immobilisée, par un flux ascendant de liquide, aura pour effet de fournir un milieu quasiment homogène et d'optimiser les échanges interfaciaux, par un accroissement des surfaces de contact enzyme immobilisée-solution.

25 La fluidisation du lit de particules peut être réalisée par un courant ascendant de fluide, en l'occurrence la solution de substrat.

30 Elle se produit lorsque la vitesse du fluide est suffisante pour mettre en suspension les particules de la masse d'enzyme immobilisée.

Chacune de ces particules est alors entourée de fluide qui la préserve de tout frottement avec les autres particules, ainsi qu'avec les parois de la colonne.

35 La couche fluidisée, mélange hétérogène de particules solides et de fluide, se comporte macroscopiquement comme un

liquide "homogène".

On peut avoir recours au dispositif montré à la figure 2 et qui comprend les éléments suivants:

- une cuve thermostatée 1 d'une capacité de 50 litres, munie d'un système d'agitation 2 et contenant la solution de substrat,
- une pompe péristaltique 3, par exemple du type Watson-Marlow,
- un manomètre à membrane 4,
- une masse 5 d'enzyme immobilisée adsorbée sur dioxyde de titane, remplissant une colonne basse pression 13, par exemple de type VA 90500,
- une canalisation 14 par laquelle la solution de substrat est acheminée à l'extrémité inférieure de la colonne 13 dans laquelle elle pénètre en 15 pour mettre en lit fluidisé la masse d'enzyme immobilisée 5,
- une canalisation 15 par laquelle la solution de substrat est extraite en 17 à l'extrémité supérieure de la colonne après avoir traversé le lit fluidisé comprenant la masse d'enzyme immobilisée 5, à la partie supérieure de la colonne 13 pour être recyclée vers la cuve 1.

Le manomètre situé à l'entrée de la colonne, à la partie inférieure de celle-ci, permet de mesurer la perte de charge subite par le liquide à travers la colonne, sachant que la pression en sortie de celle-ci est négligeable étant donné les faibles débits fournis par la pompe péristaltique.

Le liquide est thermostaté au sein de la cuve 1. Là encore, les pertes restent faibles et l'ensemble du circuit atteint rapidement la température fixée.

#### EXEMPLE 2

Digestion de  $\beta$  1-3 glucane à l'aide d'un lit fluidisé à base de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée selon l'exemple 1.

10 litres de substrat à 1% de  $\beta$  1-3 glucane, préalablement clarifiés par filtration à 2,7  $\mu$ m, sont

introduits dans la cuve thermostatée 1 dont la capacité est de 50 litres, sa hauteur étant de 47 cm et son diamètre de 39,5 cm.

5 Le thermostat est réglé à 56°C afin d'obtenir 40°C dans la cuve, température optimale de l'hydrolyse enzymatique.

La colonne 13 contient 3 grammes d'enzyme immobilisée sur 500 g de dioxyde de titane préparée conformément à l'exemple 1.

10 Une fois la température stabilisée, la pompe péristaltique est mise en route; La température varie peu ensuite car les pertes de chaleur dans la colonne et le circuit sont minimales.

15 La migration, sous l'influence du substrat, de l'enzyme immobilisée, vers le haut de la colonne 13 doit être réalisée de façon progressive afin d'éviter les turbulences. Celles-ci auraient pour effet de disperser les particules dans la colonne et favoriseraient leur migration hors de celle-ci.

20 La pompe péristaltique est réglée à pleine puissance, ce qui permet de fluidiser l'enzyme immobilisée sur une hauteur de 40 cm. Il occupe alors un volume "V gel" de 2,5 l.

Le débit associé à un tel volume est de 28 l/h.

Comparativement au procédé "lit fixe", la fluidisation permet de multiplier par 2,5 le temps de contact entre l'enzyme immobilisée et la solution de  $\beta$  1-3 glucane.

25 En outre, elle optimise la cinétique de catalyse hétérogène par la formation d'une gaine de solution autour de chaque particule.

30 Pour obtenir la digestion du  $\beta$  1-3 glucane, chaque cycle dure en moyenne de 4 à 6 heures. L'activité de l'enzyme immobilisée persiste dans ces conditions expérimentales pendant au moins 8 cycles.

On obtient ainsi 100 g d'oligo- $\beta$ -1,3-glucanes majoritairement répartis entre DP 2 et DP 6.

REVENDEICATIONS

1. Enzyme immobilisée caractérisée par le fait qu'elle est constituée par une enzyme quelconque choisie notamment dans le groupe comprenant les osidases et en particulier la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases, immobilisée par fixation à l'aide d'une liaison covalente sur un complexe solide insoluble formé entre un oxyde minéral autre que l'alumine et choisi de préférence dans le groupe comprenant notamment la zircone, la silice et le dioxyde de titane et un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate par lequel il est lié à l'oxyde minéral et, d'autre part, un groupe chimique réactif, activé en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, ce groupe chimique réactif formant la liaison covalente avec l'enzyme.

2. Procédé de préparation d'une enzyme immobilisée, caractérisé par le fait

- que l'on sélectionne

- une enzyme quelconque, de préférence dans le groupe comprenant les osidases et notamment la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases,
- un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate et, d'autre part, un groupe chimique réactif capable, après activation en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, de former une liaison covalente avec la susdite enzyme et
- un oxyde minéral autre que l'alumine en tant que support, de préférence dans le groupe comprenant la zircone, la silice et le dioxyde de titane, et

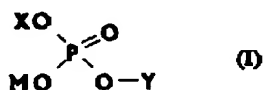
- que

- soit, dans une première étape, on fixe le composé bi- ou polyfonctionnel sur le support par son groupe réactionnel phosphate formant un complexe entre le composé et le support puis, dans une deuxième étape, on fait réagir le complexe ainsi formé avec l'enzyme de façon à créer une

liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel après avoir activé ce dernier en tant que de besoin,

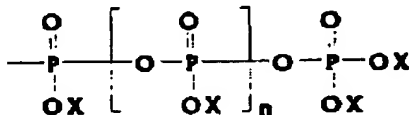
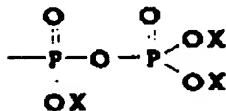
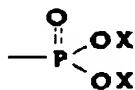
- soit, dans une première étape, on constitue une phosphoenzyme en faisant réagir le composé bi- ou polyfonctionnel avec l'enzyme de façon à former une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif, comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel, après activation en tant que de besoin, puis, dans une deuxième étape, on fixe la phosphoenzyme ainsi formée sur le support par réaction de celui-ci avec le groupe réactionnel phosphate du composé bi- ou polyfonctionnel.

3. Enzyme immobilisée selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale



dans laquelle

- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,
- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules



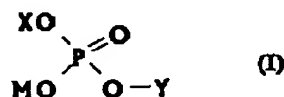
avec n variant de 1 à 100 000, et

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldehyde ou ester, est soit un  
 5 groupe alkyle linéaire ou ramifié ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie  
 10 alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldehyde, il doit être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

4. Enzyme immobilisée selon l'une des revendications  
 15 1 et 3, caractérisée par le fait que l'agent activateur est un composé chimique qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions amine ou acide carboxylique comportées par les enzymes, cet agent activateur étant mis à réagir avec ceux des composés bi- ou  
 20 polyfonctionnels qui, à titre de groupe chimique réactif, comportent une fonction amine, alcool ou acide carboxylique.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale

25



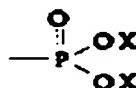
dans laquelle

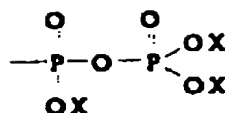
30

- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,

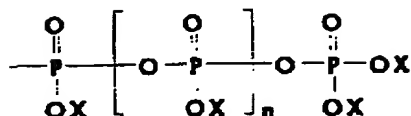
- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules

35





5



avec n variant de 1 à 100 000, et

10

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldéhyde ou ester, est soit un groupe alkyle linéaire ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle

15 pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldéhyde, il doit

20 être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

25

6. Application de l'enzyme immobilisée selon l'une des revendications 1, 3 et 4 ou obtenue selon l'une des revendications 2 et 5, au traitement des milieux à l'égard desquels ladite enzyme développe les activités pour lesquelles elle est utilisée classiquement, notamment les transformations chimiques, les purifications ou la séparation de molécules organiques, organo-minérales ou minérales.



1/1

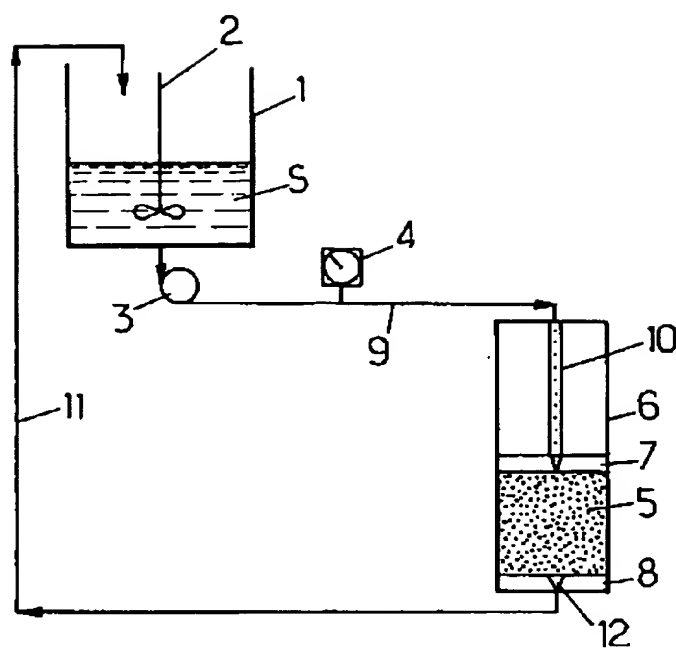


FIG.1.

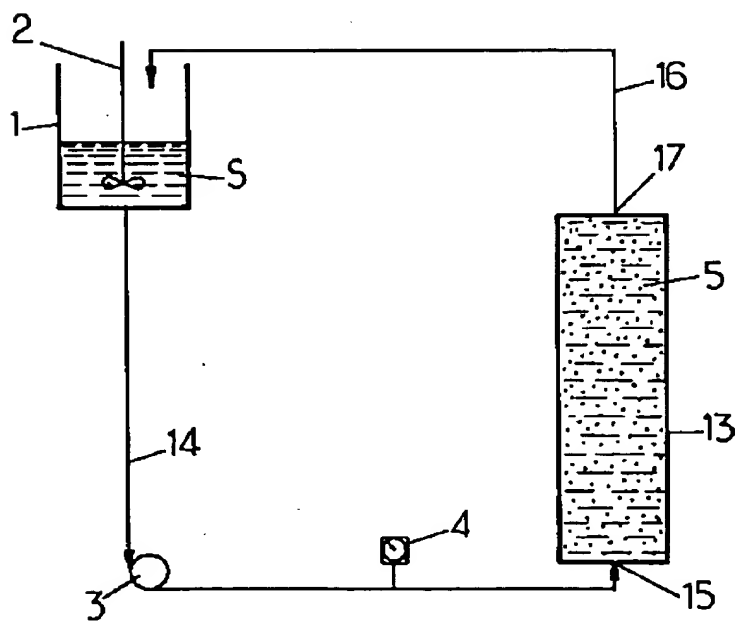


FIG.2.

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
EP 0 218 506 A (INST NAT SANTE RECH MED) 15 avril 1987 * le document en entier *	1-6
GB 2 221 466 A (ALUMINUM CO OF AMERICA) 7 février 1990 * page 8, ligne 19 - page 18, ligne 21 * * page 27, ligne 12 - page 28, ligne 15 *	1-6
DE 43 09 248 A (LORENZ BERND ;MARME STEFAN (DE); UNGER KLAUS PROF DR (DE); SCHROED) 29 Septembre 1994 * page 2, ligne 3 - ligne 58 ; revendications 1,8 *	1-6
EP 0 443 734 A (MINNESOTA MINING & MFG) 28 août 1991 * page 3, ligne 12 - page 4, ligne 23 * * page 5, ligne 12 - ligne 30 *	1-6
EP 0 273 756 A (ALUMINUM CO OF AMERICA) 6 juillet 1988 * page 2, ligne 63 - page 5, ligne 28 *	1-6
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
WO 97 20216 A (GRACE W R & CO) 5 juin 1997 WO 97 24421 A (PROCTER & GAMBLE) 10 juillet 1997	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 773 171**

②① N° d'enregistrement national :

**97 16799**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 11/14

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 31.12.97.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 02.07.99 Bulletin 99/26.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SOCIETE CIVILE ASE & BIO — FR.

⑦② Inventeur(s) : DUVAL RAPHAEL et YVIN JEAN  
CLAUDE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤④ ENZYMES IMMOBILISEES SUR UN SUPPORT, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LEURS  
APPLICATIONS.

⑤⑦ La présente invention a pour objet une enzyme immo-  
bilisée caractérisée par le fait qu'elle est constituée par une  
enzyme quelconque choisie notamment dans le groupe  
comprenant les osidases et en particulier la B 1-3 glucana-  
se, les protéases et les lipases, immobilisée par fixation à  
l'aide d'une liaison covalente sur un complexe solide insolu-  
ble formé entre un oxyde minéral autre que l'alumine et  
choisi de préférence dans le groupe comprenant notam-  
ment la zircone, la silice et le dioxyde de titane et un com-  
posé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un  
groupe fonctionnel phosphate par lequel il est lié à l'oxyde  
minéral et, d'autre part, un groupe chimique réactif, activé  
en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activa-  
teur, ce groupe chimique réactif formant la liaison covalente  
avec l'enzyme.

FR 2 773 171 - A1



**ENZYMES IMMOBILISÉES SUR UN SUPPORT, LEURS PROCÉDÉS DE  
PRÉPARATION ET LEURS APPLICATIONS**

5 L'invention a pour objet des enzymes immobilisées sur un support.

L'intérêt des enzymes immobilisées réside essentiellement dans la possibilité de les récupérer sans difficulté à partir du milieu dans lequel elles ont été mises en oeuvre  
10 et dans lequel l'enzyme proprement dite développe ses activités pour lesquelles elle est classiquement utilisée, de les purifier en tant que de besoin et de les remettre à agir dans un autre milieu.

L'invention vise également les procédés de  
15 préparation de ces enzymes immobilisées ainsi que leurs applications.

On connaît déjà des enzymes immobilisées sur un support d'alumine.

Ainsi, le document EP-A-86 402014.4 décrit l'immo-  
20 bilisation des protéases sur des alumine-phosphates organiques.

Selon ce document, la protéase est rattachée par une liaison covalente à un complexe solide formé par de l'alumine liée à un composé bi- ou polyfonctionnel  
25 comportant un groupe fonctionnel phosphate et un groupe capable de former une liaison covalente avec une protéase.

La préparation, selon le susdit document, de la protéase ainsi immobilisée, consiste à fixer sur de l'alumine, en tant que composé bifonctionnel, un phosphate  
30 organique comportant un groupe réactionnel capable de former une liaison covalente avec une protéase, puis à faire réagir le complexe ainsi formé avec la protéase après avoir éventuellement activé le groupe réactif comporté par le groupe, en ayant recours à des activateurs appropriés, de  
35 façon à former la liaison covalente recherchée liant la

protéase au complexe.

Il est également connu --voir à cet égard le document "Bioscience Reports" vol. 8, No.3, 1988, page 266-- de former dans un premier temps une phosphoprotéase en faisant réagir le composé bifonctionnel dont il a été question ci-dessus avec la protéase en question de façon à former une liaison covalente entre la protéase et le groupe chimiquement réactif comporté par ledit composé, éventuellement après activation de celui-ci, puis à fixer la phosphoprotéase ainsi constituée sur de l'alumine par réaction de celle-ci avec le groupe réactionnel phosphate comporté par le composé bifonctionnel.

La constitution chimique de l'enzyme immobilisée obtenue par le premier des deux susdits procédés, n'est pas la même que celle de l'enzyme immobilisée obtenue par le susdit deuxième procédé.

Il s'ensuit que les activités des deux types de protéases immobilisées ainsi obtenues ne sont pas identiques.

Il est enfin connu, par le susdit document, d'utiliser les enzymes ainsi immobilisées dans leurs applications classiques.

L'invention a pour objet, surtout, de répondre au souhait des utilisateurs de disposer d'un éventail aussi large que possible d'enzymes immobilisées sur un support.

Et les inventeurs ont eu le mérite de trouver que, de façon surprenante et inattendue, il est possible d'immobiliser les enzymes sur un support à base d'oxydes minéraux autre que l'alumine.

Il s'ensuit que l'enzyme immobilisée conforme à l'invention est caractérisée par le fait qu'elle est constituée par une enzyme quelconque, notamment choisie dans le groupe comprenant les osidases et en particulier la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases, immobilisée par fixation à l'aide d'une liaison covalente sur un complexe

solide insoluble formé entre un oxyde minéral autre que l'alumine et choisi de préférence dans le groupe comprenant notamment la zircone, la silice et le dioxyde de titane et un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate par lequel il est lié à l'oxyde minéral et, d'autre part, un groupe chimique réactif, activé en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, ce groupe chimique réactif formant la liaison covalente avec l'enzyme.

Le procédé de préparation de l'enzyme immobilisée conforme à l'invention est caractérisé par le fait

- que l'on sélectionne

- une enzyme quelconque, de préférence dans le groupe comprenant les osidases et notamment la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases,

- un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate et, d'autre part, un groupe chimique réactif capable, après activation en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, de former une liaison covalente avec la susdite enzyme et

- un oxyde minéral autre que l'alumine en tant que support, de préférence dans le groupe comprenant la zircone, la silice et le dioxyde de titane, et

- que

- soit, dans une première étape, on fixe le composé bi- ou polyfonctionnel sur le support par son groupe réactionnel phosphate en formant un complexe entre le composé et le support puis, dans une deuxième étape, on fait réagir le complexe ainsi formé avec l'enzyme de façon à créer une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel après avoir activé ce dernier en tant que de besoin,

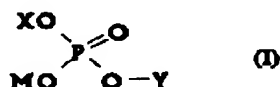
- soit, dans une première étape, on constitue une

phosphoenzyme en faisant réagir le composé bi- ou polyfonctionnel avec l'enzyme de façon à former une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif, comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel, après activation en tant que de besoin puis, dans une deuxième étape, on fixe la phosphoenzyme ainsi formée sur le support par réaction de celui-ci avec le groupe réactionnel phosphate du composé bi- ou polyfonctionnel.

L'oxyde minéral peut être utilisé sous forme de poudres ou de membranes obtenues selon des procédés classiques décrits notamment dans *"Chromatographies en phases liquide et super-critique"* par Robert Rosset, Marcel Caude et Alain Jardy, 1991, Edition Masson.

Dans un mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale

20

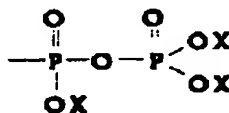
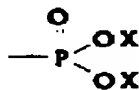


dans laquelle

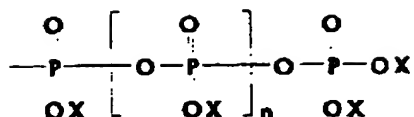
- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,

- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules

30







5 avec n variant de 1 à 100 000, et

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldéhyde ou ester, est soit un

10 groupe alkyle linéaire ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la

15 partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldéhyde, il doit être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

L'agent activateur est un composé chimique qui

20 comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions amine ou acide carboxylique comportées par les enzymes et que l'on fait réagir avec ceux des composés bi- ou polyfonctionnels qui, à titre de groupe chimique réactif, comportent une fonction amine, alcool ou

25 acide carboxylique.

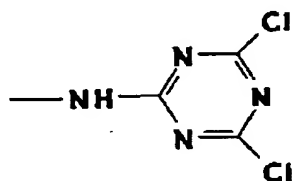
Dans un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, l'agent activateur, qui peut être mis en oeuvre selon les techniques de Howard H. Weetall publiées dans

30 "Applied Biochemistry and Biotechnology" (1993) 41, 157-188, et auquel il convient d'avoir recours quand le groupe chimique réactif comporté par ledit composé bi- ou polyfonctionnel est différent des fonctions thiol ou aldéhyde, est choisi dans le groupe comportant les dérivés

35 dont les formules sont indiquées ci-après après activation

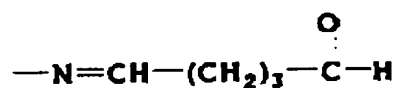
d'un groupe chimique réactif comporté par ledit composé bi- ou polyfonctionnel et constitué par une fonction amine acide carboxylique ou alcool, la nature de cette fonction étant mentionnée pour chacun desdits dérivés, à savoir

5



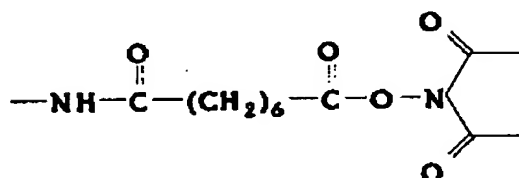
10

(activation amine + trichloro-triazine)



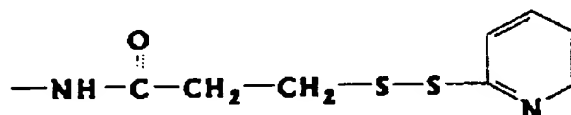
15

(activation amine + glutaraldéhyde)



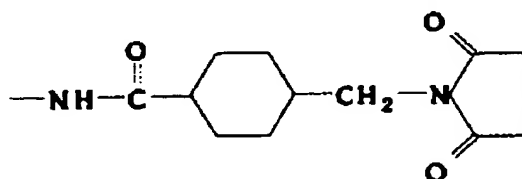
20

(activation amine + DSS ou disuccinimidy-subérate)



25

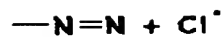
(activation amine + SPDP ou  
succinimidy-3-(2-pyridyldithio)propionate)



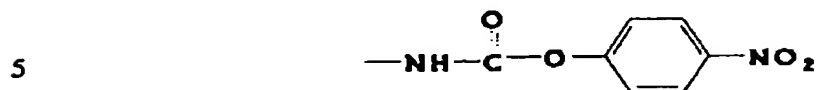
30

(activation amine + SMCC ou  
succinimidy-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate)

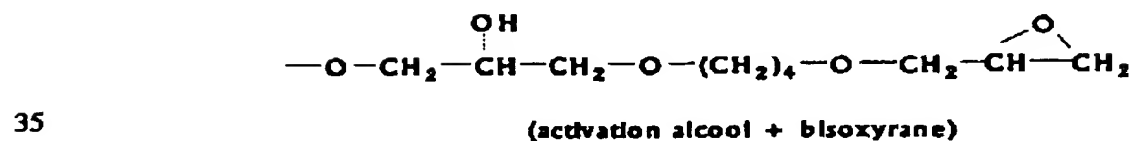
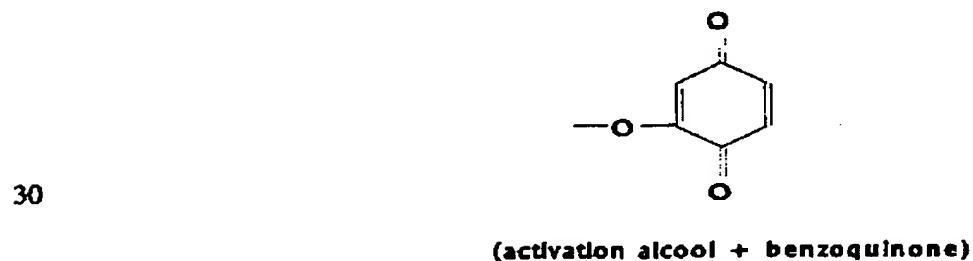
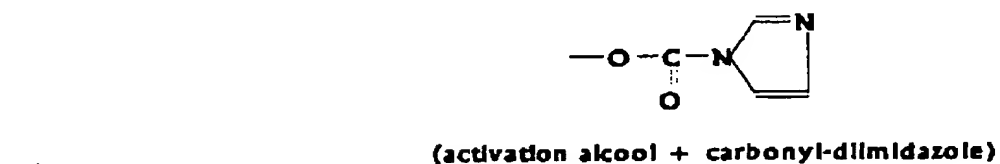
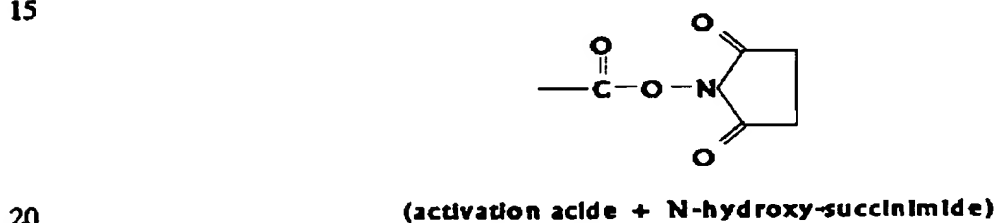
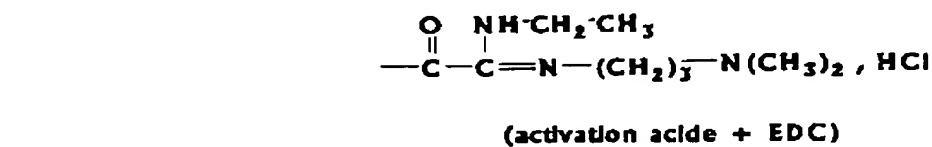
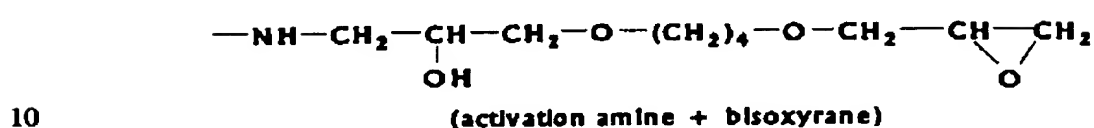
35



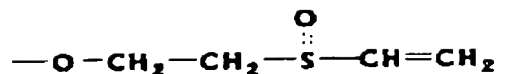
(activation amine + nitrite de sodium)



(activation amine + 4-nitrophényl-chloroformate)

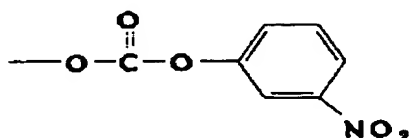


8



(activation alcool + divinylsulfone)

5

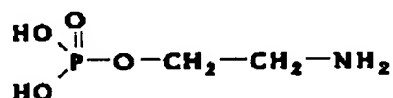


(activation alcool + 3-nitrophényl-chloroformate)

10

A titre d'exemple non limitatif mais illustrant un mode de réalisation avantageux, on indique que l'activation par mise en oeuvre des techniques décrites par Howard H. Weetall dans *"Applied Biochemistry and Biotechnology"* (1993) 41, 157-188, d'un composé bifonctionnel de formule (I) dans lequel le groupe chimique réactif activé est une fonction amine, est obtenue par réaction de cette fonction amine, comportée en l'occurrence par le 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate de formule

20



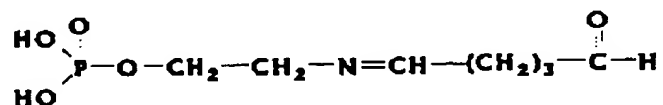
avec le glutaraldéhyde de formule

25



le composé bifonctionnel activé ainsi obtenu ayant donc une fonction 5-iminopentanal et répondant à la formule

30



35

Du point de vue pratique, on fait réagir 30 ml d'une solution aqueuse à 0,05 M du 2-aminoéthyl-dihydrogéo-

phosphate avec 30 ml d'une solution aqueuse 0,05 M de glutaraldéhyde.

5       Après 30 minutes d'agitation du mélange à une température de 20 à 25°C, la réaction est complète et la solution du composé bifonctionnel activé ainsi obtenu peut être conservée à une température de 5 à 10°C pendant 300 jours avant son utilisation ultérieure.

10       Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, la fixation du composé bi- ou polyfonctionnel sur un support à base de dioxyde de titane est réalisée en faisant réagir une solution aqueuse du composé bi- ou polyfonctionnel avec une suspension du dioxyde de titane dans un milieu aqueux.

Du point de vue pratique, on procède comme suit.

15       A une solution de 60 mg de 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate dans 100 ml d'eau à 25°C, on ajoute 3 g de dioxyde de titane.

Le mélange est maintenu sous légère agitation pendant 24 heures à pH 7.

20       Au bout de cette durée, la fixation du 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate est totale, ce qui est vérifié par le test à la ninhydrine sur une partie aliquote de filtrat.

La suspension est filtrée et le rétentat est lavé avec trois fois 100 ml d'eau.

25       On obtient ainsi l'oxyde de titane ayant fixé le 2-aminoéthyl-dihydrogénophosphate à l'état humide; on le met en suspension dans 10 ml d'une solution 1 M de glutaraldéhyde.

On ajuste le pH à 7 et on agite pendant trois heures à 20-25°C.

30       On lave avec cinq fois 100 ml d'eau.

Le complexe d'oxyde de titane activé ainsi obtenu est désigné par "Ti-Pc-Glut".

35       Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, l'immobilisation de l'enzyme par réaction avec le

groupe chimique réactif activé du composé bifonctionnel fixé sur le support à base d'oxyde minéral est effectuée en milieu aqueux et à une température de 25°C.

5 A titre d'exemple non limitatif mais illustrant un mode de réalisation avantageux, on indique que, lorsqu'il s'agit de faire réagir une protéase, par exemple la  $\alpha$ -chymotrypsine, avec le complexe obtenu ci-dessus, on procède comme indiqué ci-après.

10 3,02 grammes du complexe activé "Ti-Pc-Glut" sont mis en suspension dans 10 ml d'eau, puis mélangés à une solution aqueuse de 60 mg d' $\alpha$ -chymotrypsine. Le pH du milieu est ajusté au pH d'activité maximum de l'enzyme, à savoir 7, et doit être réajusté en cours d'expérience si nécessaire; on peut utiliser du HCl 0,1 N.

15 Par filtration de la suspension sur fritté n°4, on récupère l' $\alpha$ -chymotrypsine immobilisée sur oxyde de titane.

On désigne ce produit par l'appellation "Ti-Pc-Glut-Chymot".

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, on prépare une phosphoenzyme en faisant réagir l'enzyme en solution aqueuse sur le composé bifonctionnel de formule (I) éventuellement activé, également en solution aqueuse.

25 Lorsque le composé bifonctionnel est le résultat de la réaction du pyrophosphate de thiamine et du glutaraldéhyde et que l'enzyme est la  $\beta$  1-3 glucanase, on peut procéder comme indiqué ci-après.

30 460,8 mg ( $10^{-3}$  moles) de pyrophosphate de thiamine sont mis en solution dans 500 ml d'eau et mélangés à 400 ml d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 25% (soit 100 mg à 100% ou  $10^{-3}$  moles) et le mélange est agité pendant 3 heures à 20-25°C. On ajoute ensuite 2 g d'enzyme native, à savoir la  $\beta$  1-3 glucanase, en solution dans 1000 ml d'eau. Le pH est  
35 ajusté à 4,50 par addition de soude 0,1 N. On ajoute ensuite

250 mg de cyanoborohydrure de sodium à titre d'agent réducteur des fonctions imines. Le pH est maintenu à 4,50 à l'aide d'HCl 0,1 N ou de soude 0,1 N. Après 3 heures d'agitation, la solution réactionnelle est soumise à une dialyse pour éliminer les réactifs en excès.

On obtient ainsi la phospho- $\beta$ -1-3-glucanase désignée par "TPP-Glut"

Selon un autre mode de réalisation avantageux des susdites enzymes immobilisées et de leurs procédés de préparation, on réalise l'immobilisation de la phospho- $\beta$ -1,3-glucanase obtenue ci-dessus sur un support à base de dioxyde de titane en faisant réagir sous agitation, pendant 3 à 24 heures, une suspension de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200  $\mu$ m avec le dialysat de la phosphoenzyme obtenu ci-dessus.

La progression de l'absorption est suivie par détermination à intervalles réguliers de l'activité enzymatique résiduelle d'échantillons du filtrat du susdit mélange.

Après disparition totale de l'activité enzymatique (2 à 4 heures en général), le milieu réactionnel est filtré et lavé abondamment à l'eau.

La phosphoenzyme immobilisée ainsi obtenue est conservée telle quelle, c'est-à-dire humide, au réfrigérateur à +4°C jusqu'à utilisation. Son activité enzymatique est déterminée par hydrolyse de son substrat spécifique.

Les enzymes immobilisées conformes à l'invention sont utilisées pour le traitement des milieux à l'égard desquels elles développent les activités pour lesquelles elles sont utilisées classiquement.

Parmi ces traitements, on peut citer les transformations chimiques, les purifications ou la séparation de molécules organiques, organo-minérales ou minérales.

Les susdits traitements utilisent un milieu de mise en oeuvre aqueux ou hydroorganique ou contenant uniquement des solvants organiques; ce milieu peut être un gaz liquéfié utilisé à l'état critique, sub-critique, ou super-critique; la

température du milieu peut varier de -20°C à +200°C et la pression exercée sur le milieu peut varier de 0,1 à 300 bars en valeur absolue.

5     **EXEMPLE 1**

**Préparation de la  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur dioxyde de titane.**

On a procédé successivement suivant les deux variantes du procédé conforme à l'invention.

10     **Première variante**

Dans un réacteur en verre de 4 litres, muni d'une agitation mécanique, d'un thermomètre et d'une ampoule de coulée, on charge:

- 3 litres d'eau déminéralisée et
- 15     - 10,70 g de pyrophosphate de thiamine.

Le milieu réactionnel est agité à une température de 20-25°C jusqu'à la dissolution totale du pyrophosphate de thiamine.

On ajoute alors 500 g de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200  $\mu$ m sous agitation lente (30 t/min).

On agite pendant 15 minutes et on ajuste, si nécessaire, le pH à 4,5 avec une quantité suffisante d'acétate de sodium.

On agite pendant 12 heures à une température de 20 à 25°C à 30 t/min en vérifiant le pH toutes les heures et en le réajustant si nécessaire.

La cinétique de fixation du pyrophosphate de thiamine est suivie au moyen du test de coloration à la ninhydrine.

Après 12 heures d'agitation, l'insoluble est filtré sur fritté n°2 puis lavé abondamment avec trois fois 0,5 litre d'eau déminéralisée.

L'insoluble humide est récupéré et chargé à nouveau dans un réacteur en verre de 4 litres contenant une solution 1 M de glutaraldéhyde préalablement préparée en mélangeant  
35     270 ml de glutaraldéhyde 5,6 M (commercialisée par la Société



FLUKA sous la référence 49629) avec 1231 ml d'eau déminéralisée.

On agite à 30 t/min et à une température de 20 à 25°C pendant 24 heures.

5 On filtre sur fritté n°2 puis on lave avec trois fois 0,5 litre d'eau déminéralisée.

L'insoluble humide est récupéré et chargé dans un réacteur de 4 litres contenant une solution préalablement préparée en dissolvant 3 g de  $\beta$  1-3 glucanase commercialisée sous la marque GLUCANEX par la Société NOVO INDUSTRIES dans 1,5 litres d'acétate de sodium 2,1 M de pH 4,55.

10 On agite à une température de 20 à 25°C pendant 24 heures à une vitesse de 30 t/min.

On filtre sur fritté n°2 et on lave le résidu de filtration trois fois avec 0,5 litre d'eau déminéralisée.

15 On récupère le précipité humide constitué par l'enzyme immobilisée recherchée et on le conserve à une température de 4 à 6°C jusqu'à l'utilisation.

#### Deuxième variante

20 Dans un réacteur en verre de 20 litres, muni d'une agitation, d'un thermomètre et d'une ampoule de coulée, on charge:

- 4,61 g de pyrophosphate de thiamine et
- 5 litres d'eau déminéralisée.

25 On agite jusqu'à dissolution totale.

On additionne par l'ampoule de coulée, en veillant à ce que la température ne dépasse pas 30°C, 4 litres de glutaraldéhyde en solution aqueuse à 25%.

30 On agite la solution ainsi obtenue pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C.

On ajoute ensuite une solution, préalablement préparée, de 20 g de  $\beta$  1-3 glucanase commercialisée sous la marque GLUCANEX par la Société NOVO INDUSTRIES dans 10 litres d'eau déminéralisée.

35 On ajuste le pH à 4,5 avec la quantité nécessaire de

soude 0,1 N.

On agite pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C, puis on refroidit à 20°C.

5 On ajoute ensuite en une seule fois 2.5 g de cyanoborohydrure de sodium.

On agite ensuite pendant 3 heures à une température de 20 à 30°C, puis on soumet le milieu réactionnel à une dialyse.

10 On récupère le dialysat et on le charge dans un réacteur en verre de 20 litres muni d'une agitation réglée à 30 t/min.

On ajoute ensuite dans la masse réactionnelle 1 kg de dioxyde de titane d'une granulométrie de 40 à 200 µm.

On agite encore pendant 24 heures à une température de 20 à 25°C et on filtre sur fritté n°2 ou au buchner.

15 On lave le résidu avec trois fois 3 litres d'eau déminéralisée.

On conserve le résidu humide constituant l'enzyme immobilisée recherchée à une température de 4°C jusqu'à son utilisation.

20

\* \* \*

25 La mise en oeuvre de la  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée obtenue à l'exemple 1, par exemple pour "digérer" un substrat constitué par du  $\beta$  1-3 glucane, peut être réalisée en lit fixe ou en lit fluidisé.

Ci-après, on décrit les deux modes de réalisation en question.

30 Lorsqu'on a recours au lit fixe, on fait circuler la solution de substrat à travers un lit fixe de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur dioxyde de titane telle qu'obtenue à l'exemple 1.

Cette enzyme immobilisée est tassée, par exemple par compression pneumatique dans une colonne basse pression; on peut utiliser celle de type Vantage A de marque AMICON.

La solution de substrat circule en circuit fermé.

35 Pour une efficacité optimale, on détermine un compromis entre le réglage du débit, le temps de séjour de

la solution au contact de l'enzyme immobilisée (qui doit être suffisamment important pour permettre la réalisation de l'hydrolyse enzymatique) et le temps de passage d'un volume entier de solution à travers le circuit (temps qui doit être  
5 relativement court, afin de réaliser un maximum de passages en un temps donné).

La durée totale de séjour au contact de l'enzyme immobilisée ne dépend que du volume de cette dernière et de la durée totale de l'opération.

10 Un essai est réalisé sur 10 litres d'une solution de  $\beta$  1-3 glucane à 10 g/l, préalablement clarifiée par filtration à 1,6  $\mu$ m.

Le dispositif utilisé, montré à la figure 1, comprend les éléments suivants:

- 15 - une cuve thermostatée 1 d'une capacité de par exemple 50 litres, munie d'un système d'agitation 2 et contenant la solution de substrat,
- une pompe péristaltique 3, par exemple du type Watson-Marlow,
- 20 - un manomètre à membrane 4,
- une masse 5 d'enzyme  $\beta$  1-3 glucanase fixée sur dioxyde de titane, tassée entre deux plateaux 7 et 8 dans une colonne 6 basse pression,
- une canalisation 9 par laquelle la solution de  
25 substrat est acheminée vers la colonne 6 à l'intérieur de laquelle elle est amenée par un tube 10 traversant le plateau 7 jusqu'à la surface de la masse 5,
- une canalisation 11 par laquelle la solution de  
30 substrat ayant traversé le lit d'enzyme immobilisée est extraite de la colonne 6 à travers le plateau 8 grâce à un trou 12 et recyclée vers la cuve 1.

Le manomètre situé en amont de la colonne permet de mesurer la perte de charge provoquée par le lit d'enzyme immobilisée, sachant que la pression en sortie de colonne  
35 est négligeable étant donné les faibles débits de l'ordre de

10 l/h fournis par la pompe péristaltique. On constate qu'à débit nul, le manomètre indique une faible pression (inférieure à 0,5 bar) probablement due à un accroissement local de celle-ci entre la pompe et l'entrée de la colonne du fait de la conception du circuit.

5 La masse d'enzyme immobilisée dans le mode de réalisation montré est de 3 grammes de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée sur 500 g de dioxyde de titane; elle est tassée sur une hauteur de 14,5 cm, ce qui, compte tenu des dimensions de la colonne (hauteur égale à 47,5 cm et diamètre égal à 6,2 cm), correspond à un volume d'enzyme immobilisée de 0,9 litre.

10 La solution de substrat est thermostatée à 40°C au sein de la cuve 1. Les pertes de chaleur étant relativement faibles, l'ensemble du circuit atteint rapidement cette température, ensuite entretenue par la circulation du liquide.

15 Une quantité de 10 litres de substrat à 1% de  $\beta$  1-3 glucane, préalablement clarifié par filtration à 1,6  $\mu$ m, est introduite dans la cuve thermostatée. Le thermostat est réglé à 56°C afin d'obtenir 40°C dans la cuve, température optimale de l'hydrolyse enzymatique. Une fois la température stabilisée, la pompe péristaltique est mise en route. La température varie peu ensuite, car les pertes de chaleur dans la colonne et le circuit sont minimales.

20 La puissance de la pompe péristaltique est réglée de façon à obtenir une pression de 1,5 bar à l'entrée de la colonne. Au-delà d'une telle pression, l'enzyme immobilisée subit des contraintes qui, à plus ou moins long terme, pourraient affecter son efficacité et sa stabilité. Le débit associé à une telle pression est de 13,2 l/h.

25 Dans ces conditions, le temps de passage "t-passage" est de 45 minutes. A chaque passage dans la colonne, le temps de séjour "t-séjour" au contact de l'enzyme est de 4 minutes. La circulation de la solution de substrat est

effectuée durant 5 heures 30 minutes.

Les cinétiques réactionnelles obéissent à des phénomènes de transports interfaciaux. Ceux-ci sont un facteur limitant dans la réaction d'hydrolyse enzymatique.

5 Le procédé "lit fixe" qui en lui-même est satisfaisant, présente un inconvénient qui est dû à l'hétérogénéité existant entre le lit de particules et la solution qui le traverse, ce qui a pour effet de placer la réaction d'hydrolyse sous contrôle diffusionnel.

10 De plus, progressivement, il se crée dans ce lit des canaux préférentiels de circulation du liquide.

Dès lors, certaines régions du lit ne sont plus irriguées et les molécules qui traversent les canaux préférentiels ne sont plus mises au contact du lit et donc de l'enzyme.

15 Cet inconvénient n'est toutefois pas de nature à rendre inutilisable le procédé en lit fixe.

On peut néanmoins remédier à cet inconvénient en ayant recours à un système à lit fluidisé.

20 La fluidisation du lit de particules d'enzyme immobilisée, par un flux ascendant de liquide, aura pour effet de fournir un milieu quasiment homogène et d'optimiser les échanges interfaciaux, par un accroissement des surfaces de contact enzyme immobilisée-solution.

25 La fluidisation du lit de particules peut être réalisée par un courant ascendant de fluide, en l'occurrence la solution de substrat.

30 Elle se produit lorsque la vitesse du fluide est suffisante pour mettre en suspension les particules de la masse d'enzyme immobilisée.

Chacune de ces particules est alors entourée de fluide qui la préserve de tout frottement avec les autres particules, ainsi qu'avec les parois de la colonne.

35 La couche fluidisée, mélange hétérogène de particules solides et de fluide, se comporte macroscopiquement comme un

liquide "homogène".

On peut avoir recours au dispositif montré à la figure 2 et qui comprend les éléments suivants:

- une cuve thermostatée 1 d'une capacité de 50 litres, munie d'un système d'agitation 2 et contenant la solution de substrat,
- une pompe péristaltique 3, par exemple du type Watson-Marlow,
- un manomètre à membrane 4,
- une masse 5 d'enzyme immobilisée adsorbée sur dioxyde de titane, remplissant une colonne basse pression 13, par exemple de type VA 90500,
- une canalisation 14 par laquelle la solution de substrat est acheminée à l'extrémité inférieure de la colonne 13 dans laquelle elle pénètre en 15 pour mettre en lit fluidisé la masse d'enzyme immobilisée 5,
- une canalisation 15 par laquelle la solution de substrat est extraite en 17 à l'extrémité supérieure de la colonne après avoir traversé le lit fluidisé comprenant la masse d'enzyme immobilisée 5, à la partie supérieure de la colonne 13 pour être recyclée vers la cuve 1.

Le manomètre situé à l'entrée de la colonne, à la partie inférieure de celle-ci, permet de mesurer la perte de charge subite par le liquide à travers la colonne, sachant que la pression en sortie de celle-ci est négligeable étant donné les faibles débits fournis par la pompe péristaltique.

Le liquide est thermostaté au sein de la cuve 1. Là encore, les pertes restent faibles et l'ensemble du circuit atteint rapidement la température fixée.

#### EXEMPLE 2

Digestion de  $\beta$  1-3 glucane à l'aide d'un lit fluidisé à base de  $\beta$  1-3 glucanase immobilisée selon l'exemple 1.

10 litres de substrat à 1% de  $\beta$  1-3 glucane, préalablement clarifiés par filtration à 2,7  $\mu$ m, sont

introduits dans la cuve thermostatée 1 dont la capacité est de 50 litres, sa hauteur étant de 47 cm et son diamètre de 39,5 cm.

5 Le thermostat est réglé à 56°C afin d'obtenir 40°C dans la cuve, température optimale de l'hydrolyse enzymatique.

La colonne 13 contient 3 grammes d'enzyme immobilisée sur 500 g de dioxyde de titane préparée conformément à l'exemple 1.

10 Une fois la température stabilisée, la pompe péristaltique est mise en route; La température varie peu ensuite car les pertes de chaleur dans la colonne et le circuit sont minimales.

15 La migration, sous l'influence du substrat, de l'enzyme immobilisée, vers le haut de la colonne 13 doit être réalisée de façon progressive afin d'éviter les turbulences. Celles-ci auraient pour effet de disperser les particules dans la colonne et favoriseraient leur migration hors de celle-ci.

20 La pompe péristaltique est réglée à pleine puissance, ce qui permet de fluidiser l'enzyme immobilisée sur une hauteur de 40 cm. Il occupe alors un volume "V gel" de 2,5 l.

Le débit associé à un tel volume est de 28 l/h.

Comparativement au procédé "lit fixe", la fluidisation permet de multiplier par 2,5 le temps de contact entre l'enzyme immobilisée et la solution de  $\beta$  1-3 glucane.

25 En outre, elle optimise la cinétique de catalyse hétérogène par la formation d'une gaine de solution autour de chaque particule.

30 Pour obtenir la digestion du  $\beta$  1-3 glucane, chaque cycle dure en moyenne de 4 à 6 heures. L'activité de l'enzyme immobilisée persiste dans ces conditions expérimentales pendant au moins 8 cycles.

On obtient ainsi 100 g d'oligo- $\beta$ -1,3-glucanes majoritairement répartis entre DP 2 et DP 6.

REVENDICATIONS

1. Enzyme immobilisée caractérisée par le fait qu'elle est constituée par une enzyme quelconque choisie notamment dans le groupe comprenant les osidases et en particulier la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases, immobilisée par fixation à l'aide d'une liaison covalente sur un complexe solide insoluble formé entre un oxyde minéral autre que l'alumine et choisi de préférence dans le groupe comprenant notamment la zircone, la silice et le dioxyde de titane et un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate par lequel il est lié à l'oxyde minéral et, d'autre part, un groupe chimique réactif, activé en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, ce groupe chimique réactif formant la liaison covalente avec l'enzyme.

2. Procédé de préparation d'une enzyme immobilisée, caractérisé par le fait

- que l'on sélectionne

- une enzyme quelconque, de préférence dans le groupe comprenant les osidases et notamment la  $\beta$  1-3 glucanase, les protéases et les lipases,
- un composé bi- ou polyfonctionnel comportant, d'une part, un groupe fonctionnel phosphate et, d'autre part, un groupe chimique réactif capable, après activation en tant que de besoin par mise en oeuvre d'un agent activateur, de former une liaison covalente avec la susdite enzyme et
- un oxyde minéral autre que l'alumine en tant que support, de préférence dans le groupe comprenant la zircone, la silice et le dioxyde de titane, et

30 - que

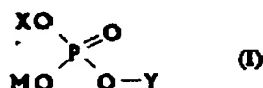
- soit, dans une première étape, on fixe le composé bi- ou polyfonctionnel sur le support par son groupe réactionnel phosphate formant un complexe entre le composé et le support puis, dans une deuxième étape, on fait réagir le complexe ainsi formé avec l'enzyme de façon à créer une



liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel après avoir activé ce dernier en tant que de besoin,

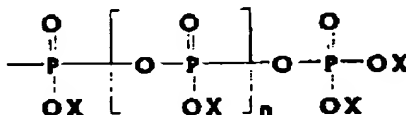
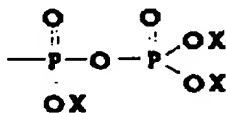
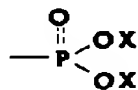
- soit, dans une première étape, on constitue une phosphoenzyme en faisant réagir le composé bi- ou polyfonctionnel avec l'enzyme de façon à former une liaison covalente entre l'enzyme et le groupe chimique réactif, comporté par le composé bi- ou polyfonctionnel, après activation en tant que de besoin, puis, dans une deuxième étape, on fixe la phosphoenzyme ainsi formée sur le support par réaction de celui-ci avec le groupe réactionnel phosphate du composé bi- ou polyfonctionnel.

3. Enzyme immobilisée selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale



dans laquelle

- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,
- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules



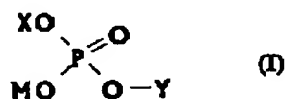
avec n variant de 1 à 100 000, et

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldehyde ou ester, est soit un  
5 groupe alkyle linéaire ou ramifié ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie  
10 alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldehyde, il doit être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

4. Enzyme immobilisée selon l'une des revendications  
15 1 et 3, caractérisée par le fait que l'agent activateur est un composé chimique qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions amine ou acide carboxylique comportées par les enzymes, cet agent activateur étant mis à réagir avec ceux des composés bi- ou  
20 polyfonctionnels qui, à titre de groupe chimique réactif, comportent une fonction amine, alcool ou acide carboxylique.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le composé bi- ou polyfonctionnel est choisi dans le groupe de ceux présentant la formule générale

25



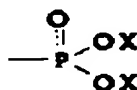
dans laquelle

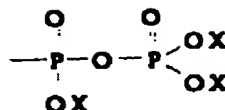
30

- X représente un atome d'hydrogène ou de métal alcalin,

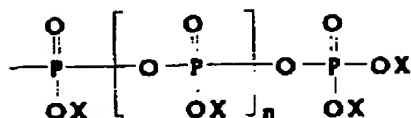
- M représente X ou l'un des groupes phosphates de formules

35





5



avec n variant de 1 à 100 000, et

10

- Y, qui comporte au moins un groupe chimique réactif choisi dans le groupe comprenant les fonctions amine, acide carboxylique, alcool, thiol, aldéhyde ou ester, est soit un groupe alkyle linéaire ou ramifié en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe aryle ou polyaryle

15 pouvant comporter un ou plusieurs hétéroatomes, soit un groupe alkylaryle ou arylalkyle dans lequel la partie alkyle est en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub> et peut comporter, comme la partie aryle, un ou plusieurs hétéroatomes, étant entendu que, lorsque le groupe chimique réactif est différent des fonctions thiol et aldéhyde, il doit

20 être activé par réaction du composé de formule (I) avec un agent activateur.

25

6. Application de l'enzyme immobilisée selon l'une des revendications 1, 3 et 4 ou obtenue selon l'une des revendications 2 et 5, au traitement des milieux à l'égard desquels ladite enzyme développe les activités pour lesquelles elle est utilisée classiquement, notamment les transformations chimiques, les purifications ou la séparation de molécules organiques, organo-minérales ou minérales.

1/1

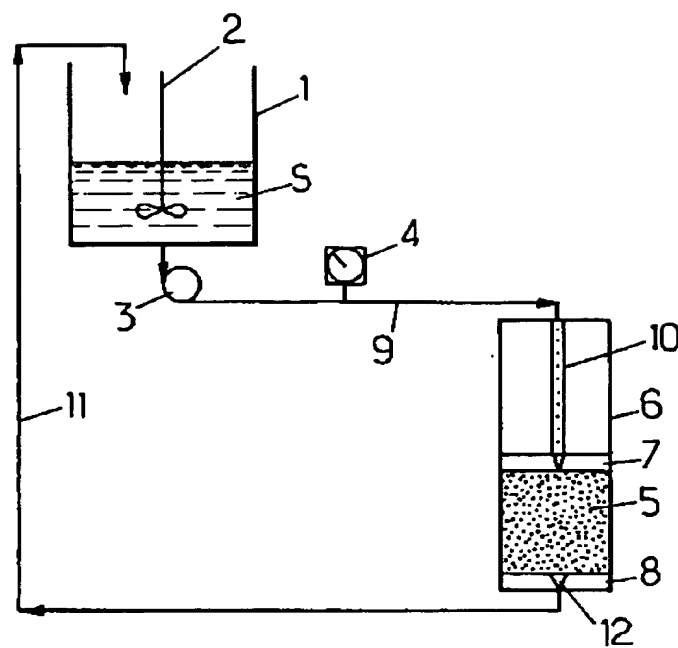


FIG.1.

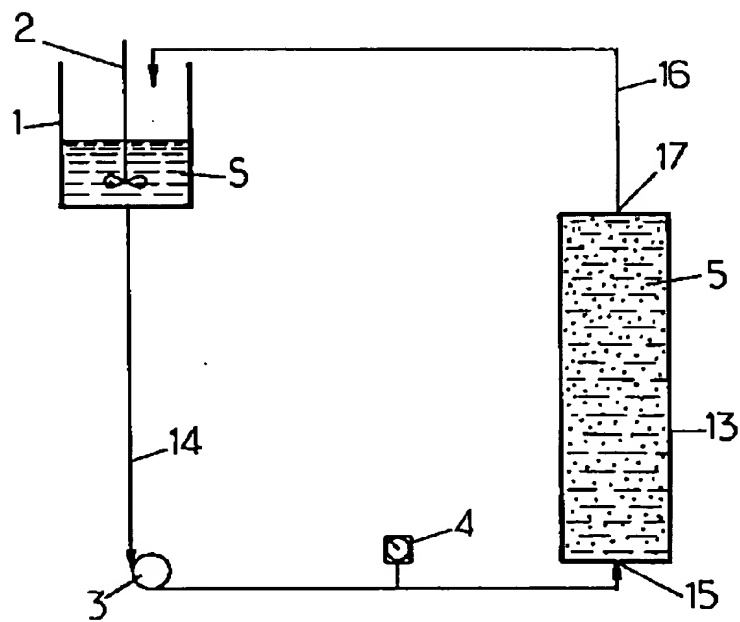


FIG.2.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2773171

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 552503  
FR 9716799

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,Y	EP 0 218 506 A (INST NAT SANTE RECH MED) 15 avril 1987 * le document en entier *	1-6
Y	GB 2 221 466 A (ALUMINUM CO OF AMERICA) 7 février 1990 * page 8, ligne 19 - page 18, ligne 21 * * page 27, ligne 12 - page 28, ligne 15 *	1-6
Y	WO 97 20216 A (GRACE W R & CO) 5 juin 1997 * page 3, ligne 22 - page 5, ligne 27 *	1-6
Y	DE 43 09 248 A (LORENZ BERND ;MARME STEFAN (DE); UNGER KLAUS PROF DR (DE); SCHROED) 29 septembre 1994 * page 2, ligne 3 - ligne 58; revendications 1,8 *	1-6
Y	EP 0 443 734 A (MINNESOTA MINING & MFG) 28 août 1991 * page 3, ligne 12 - page 4, ligne 23 * * page 5, ligne 12 - ligne 30 *	1-6
Y	EP 0 273 756 A (ALUMINUM CO OF AMERICA) 6 juillet 1988 * page 2, ligne 63 - page 5, ligne 28 *	1-6
A	WO 97 24421 A (PROCTER & GAMBLE) 10 juillet 1997 * page 3, alinéa 3 * * page 5, alinéa 1 *	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.8)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
11 septembre 1998		Sitch, W
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1503 03.92 (P4C11)